

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2000-504569

(P2000-504569A)

(43)公表日 平成12年4月18日 (2000.4.18)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマコト^{*} (参考)

A 2 3 J 3/12

A 2 3 J 3/12

1/04

1/04

1/06

1/06

A 2 3 L 3/37

A 2 3 L 3/37

A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 21 頁)

(21)出願番号 特願平9-528157

(86) (22)出願日 平成9年2月5日(1997.2.5)

(85)翻訳文提出日 平成10年8月7日(1998.8.7)

(86)国際出願番号 PCT/EP97/00547

(87)国際公開番号 WO97/28698

(87)国際公開日 平成9年8月14日(1997.8.14)

(31)優先権主張番号 96200309.1

(32)優先日 平成8年2月9日(1996.2.9)

(33)優先権主張国 ヨーロッパ特許庁 (EP)

(71)出願人 ソシエテ デ プロデュイ ネツスル ソ
シエテ アノニム

スイス国 シーエィチー1800 ブベイ, ケ
ース ポスタル 353

(72)発明者 ジャン, アルフレッド

フランス国 エフ-74500 ピュブリエ,
ルート ド ペイード-キャボ

(72)発明者 ルンドヘイム, ロルブ
ノルウェー国 エヌ-7010 トロンドヘイ
ム, グリタ 2, デブト. オブ エコート
キシコロジイ, アルフォルスク

(74)代理人 弁理士 浅村 哲 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】氷結晶生長阻害剤

(57)【要約】

氷結晶生長阻害剤およびこのような剤の抽出方法が記載される。本方法によれば、Zoarcetes viviparus の血液を抽出し、冷却し、氷結晶生長阻害剤を含有するZoarcetes viviparus 血清を構成する上澄を集め、冷凍する。剤を食品の製造に使用する方法も開示される。

【特許請求の範囲】

1. *Zoarcetes viviparus* 血清を集め、血清タン白を単離し、
タン白をゲル濾過により分離し、次いで1°～1.8°Cの熱ヒステリシスを有す
るタン白画分を単離する方法により得ることができる、4～5.5 KDa の分子
量を有する氷結晶生長阻害剤。
2. 1. 3°～1.5°Cの熱ヒステリシスを有する、請求項1記載の氷結晶生
長阻害剤。
3. 氷結晶生長阻害剤を含有する*Zoarcetes viviparus* 血清を
調製する、氷結晶生長阻害剤抽出物の製造方法。
4. -*Zoarcetes viviparus* 血液を抽出し、
-冷却し、
-氷結晶生長阻害剤を含有する*Zoarcetes viviparus* 血清を構
成する上澄を集め、
-次に上澄を冷凍する、
請求項3記載の方法。
5. 請求項1または2に記載の*Zoarcetes viviparus* から抽出
し、または請求項3または4に記載の方法により得た少なくとも1種の氷結晶生
長阻害剤を食品に添加する、氷結晶の大きさの減縮方法。
6. 0.01～10%の氷結晶生長阻害剤を添加する、請求項5記載の方法。
7. 少なくとも1種の氷結晶生長阻害剤を添加した食品を冷凍する、請求項5
記載の方法。
8. 食品は-15°～-40°Cの温度で冷凍する、請求項7記載の方法。

【発明の詳細な説明】

氷結晶生長阻害剤

本発明の主題は氷結晶生長阻害剤、このような剤の製造方法およびこれらの剤を食品の製造に使用する方法である。

「熱ヒステリシスタン白」と呼ばれる氷結晶生長阻害剤は氷結晶に結合し、これらの生長を低減する能力を有することが知られる（バイオフィジカル ジャーナル、1991年2月、p 409~418）。これらの剤の2つの性質は証明されている、すなわちこれらは解凍温度に影響を与えることなく溶液の明らかな凍結温度を下げる能力を有し、また氷結晶の再結晶化を阻害する能力も有する（クライオバイオロジー、25巻、1988、p 55~60）。

さらに、これらの型の氷結晶生長阻害剤は特に北極および南極の或る種の魚類で実証された（F A S E B ジャーナル、1990年5月、p. 2460~2468）。これらの剤はタン白構造またはグリコタン白構造を有する。これらはこれらの魚類のプラズマまたは血清から単離され、次いで精製される。しかし、これらは他の組織にも存在する。

氷結晶生長阻害剤を使用して冷凍デザート、冷凍ペーストのような冷凍製品またはトマトのような生鮮品などの食品品質を改良することも知られる。DNA プラント テクノロジー コープは非常に低い温度条件下で生存しうる或る種の魚類または他の生物に見出すことができるものに似た氷結晶生長阻害剤である人工タン白を合成した（フード プロセシング、1992年10月、p 55）。

しかし、現在まで氷結晶生長阻害剤は特にノルウェーの沿岸およびバルト海沿岸に棲息する魚、ゾーシズ・ビビパルス (*Zoarces viviparus*) からは単離されていない。

本発明の目的は顕著な活性レベルを有し、例えば食品のような製品の冷凍または組織化に特に有利に使用しうる新規氷結晶生長阻害剤を供することである。

このため、本発明氷結晶生長阻害剤は *Zoarces viviparus* から抽出された分子量4~5.5 KDa を有する剤であり、これは *Zoarces viviparus*

Zoarces viviparus 血清を収集し、血清タン白を単離し、タン白をゲル濾過に

より分離し、1～1.8℃の熱ヒステリシスを有するタン白画分を単離する方法により得ることができる。

好ましくは、これらの氷結晶生長阻害剤は1.3～1.5℃の熱ヒステリシスを示す。

意外なことに、これらの氷結晶生長阻害剤は例えアイスクリーム、冷凍デザート、または冷凍ペーストのような食品の冷凍中氷結晶の寸法を効果的に低減し、食品に一層滑かなテクスチャーを付与できることが認められた。

以下の記載で、「結晶阻害剤」は「氷結晶生長阻害剤」の意味で使用する。

以下の記載で、「結晶の一般的寸法」は「主として見出される氷結晶の寸法」の意味で使用する。

以下の記載で、「等しい直径」は考えられる結晶の像として同じ表面積を有する円の直径」の意味で使用する。

本発明氷結晶生長阻害剤の抽出物の製造方法では、この剤を含有するZoarcetes viviparus血清を調整する。

このため、Zoarcetes viviparus血液を抽出し、冷却し、氷結晶生長阻害剤含有Zoarcetes viviparus血清を構成する上澄を集め、次いで例えば上澄は凍結できる。

Zoarcetes viviparus血液は処理毛管により、特に例えばヘパリンナトリウムにより処理した毛管により抽出できる。

Zoarcetes viviparus血液は0～5℃、特に例えば血液に含まれるプロテアーゼおよびペプチダーゼの活性を阻害するために冷却できる。

氷結晶生長阻害剤含有Zoarcetes viviparus血清を構成する上澄は例えば0～5℃で5～15分、1000～5000gでZoarcetes viviparus血液を遠心分離して集めることができる。このため、例えばCH-1227カルージュ・ジュネーブ、ジェーン通り、23、ヘレウス社が市販するヘレウスミニヒュージGL型遠心分離機は使用できる。

上澄は例えば-15°～-40℃の温度で冷凍できる。

本発明は氷結晶の大きさの低減方法にも関する。この方法ではZoarcetes

v i v i p a r u s から抽出した少なくとも 1 種の氷結晶生長阻害剤を食品に添加する。特に 0.01 ~ 10% の本発明氷結晶生長阻害剤を食品の製造中食品に添加できる。

こうして製造した食品は次に例えれば冷凍できる。特に -15° ~ -40°C の温度で冷凍できる。

本発明結晶生長阻害剤は特に下記各種試験により測定した生化学的データおよび各種性質を通じて一層詳細に記載する。% は特記しない限り重量で示す。

Zoarcles viviparus 血清の存在で 20% 蔗糖溶液から氷結晶の結晶化の証明

1 ml の 20% 蔗糖溶液 6 試料を調整し、これに結晶阻害剤を含有する *Zoarcles viviparus* 血清を各種濃度で添加する。

試料は冷蔵庫に保存後ライヘルトーユング、ハルナルゼル ハウプトストラッセ 219, AT-1170 ウィーンが市販するポリバル型顕微鏡下に置き、リンクム サイエンティフィック インストゥルメンツ社、エブソムダウンズ メトロ センター、ウォターフィールド、タドワース、サリー、KT205HT, 英国が市販するリンクム型温度調整器により -100°C の温度に急速冷却する。

次に、試料は -9°C の温度に加熱し、こうして調整した試料に含まれる結晶の寸法は 30 ~ 120 分の間隔内でポリバル型顕微鏡下で観察する。

平行して 1 ml の 20% 蔗糖溶液を含有する対照試料を同じ条件下で調整する。

20% 蔗糖溶液試料に添加する結晶阻害剤含有 *Zoarcles viviparus* 血清の % は容量で示す。

試料 1 : 1. 3% の *Zoarcles viviparus* 血清を 1 ml の 20% 蔗糖溶液に添加し、次に試料を上記のように調製する。-9°C で 60 分後、結晶は 2 μm 未満の代表的寸法を有する。経時的に結晶の寸法の変化は認められない。

試料 2 : 1% の *Zoarcles viviparus* 血清を 1 ml の 20% 蔗糖溶液に添加し、次に試料を上記のように調製する。-9°C で 30 分後、結晶は 2 μm 未満の代表的寸法を有する。経時的に結晶の寸法の変化は認められない。

試料3 : 0. 1%のZoarcetes viviparus血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。-9°Cで30分後、結

晶は15μm未満の代表的寸法を有する。結晶の寸法は経時にごく僅かだけ変化する。-9°Cで120分後、結晶の代表的寸法は15μm未満のままであり、結晶ははっきりした角度のある形状を有する。

試料4 : 0. 02%のZoarcetes viviparus血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。結晶の寸法は-9°Cで6分～90分間に僅かに変化する。結晶の代表的寸法は-9°Cで90分後20μm未満である。結晶ははっきりした角度のある形状を有する。

試料5 : 0. 013%のZoarcetes viviparus血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。0. 02%のZoarcetes viviparus血清により調製した試料の場合と同じ変化が結晶の寸法に認められる。結晶の代表的寸法は-9°Cで90分後20μmより大きい。結晶は僅かに円い角度の形状を有する。

試料6 : 0. 01%のZoarcetes viviparus血清を1mlの20%蔗糖溶液に添加し、次いで試料を上記のように調製する。0. 013%のZoarcetes viviparus血清により調製した試料の場合より大きい変化が結晶の寸法に認められる。さらに、結晶は0. 013%のZoarcetes viviparus血清により調製した試料の場合より一層円い形状を有する。

結晶の代表的寸法は-9°Cで90分後25μmより大きい。

対照試料 : 20%蔗糖溶液を上記のように調製するが、Zoarcetes viviparus血清はこれに添加しない。結晶は急速に大きく生長する。その形状は円く、-9°Cで90分後、結晶の代表的寸法は25μmより大きい。こうして、1. 3～0. 013%濃度でZoarcetes viviparus血清を20%蔗糖溶液に添加する場合、経時にごく僅かだけその寸法が変化する比較的小さい氷結晶が顕微鏡下で観察される。

他方、非常に低濃度のZoarcetes viviparus血清を20%蔗糖

溶液に添加する場合、氷結晶は一層急速に大きく生長する。

試料6と対照試料間では氷結晶の形状および寸法の変化にほとんど差が認められない限界がある。20%蔗糖溶液に含まれるZoarcetes viviparus血清濃度が0.01%~10%間である場合、結晶の形状は

血清を含有しない対照溶液の結晶の形状より一層はつきりした角度を有する。

熱ヒステリシスの測定

この分析はクリフトン テクニカル フィジックス、P. O. ボックス、ハートフォード、米国、ニューヨーク、12830が市販するクリフトン ナノリッター オスマーメータ型温度調整器およびライカA. G. フェルカウフスゲゼールシャフト、カナルストラッセ21、CH-8152 グラットブルグが市販するワイルド MZ 8型立体顕微鏡により行なう。

このため、20ml画分のZoarcetes viviparus血清試料を室温で集め、温度調整器に置いた容器に入れる。この容器は流動パラフィンを含有する。急速凍結後徐々に解凍する。結晶の解凍は立体顕微鏡により観察する。次に、残留する唯一の小結晶を安定化するためにこの解凍は緩慢にし、停止し、温度を記録する。この温度が解凍点である。次に穩かな冷却を行ない、結晶の大きさが生長を始める温度を記録する。この温度が見掛けの凍結点である。

次に熱ヒステリシス値を見掛け凍結点と解凍点間の差を計算することにより算定する。Zoarcetes viviparus血清画分の熱ヒステリシス値は1.4°Cであり、この値はこのような剤を含有する魚に対し高値に相当する。

Zoarcetes viviparusから抽出した氷結晶生長阻害剤の特徴

Zoarcetes viviparusから抽出した氷結晶生長阻害剤はクロマトグラフ分析ならびにポリアクリルアミドゲル電気泳動による分離から特徴が分かる。

従ってクロマトグラフ分析は最初に行なう。このため、Zoarcetes viviparus血清に含有される20mgのタン白は、ウォータズA. G. , フォルケツツウィル、CHが市販するウォータズ519ポンプおよびDADウォータズ990検知器を備えたファーマシア バイオテクA. G. , デューベンドル

フ, CHが市販するスプローズ12カラムで分離する。液体クロマトグラフィにより分離を行なうために、pH 7.8の150mM炭酸アンモニウム緩衝液を0.5ml/分の流速で移動相として使用する。

クロマトグラフィにより溶離した画分を使用して、熱ヒステリシスの測定を試験「熱ヒステリシスの測定」に記載のように行なう。30~33分間に溶離する

画分はZoarcetes viviparus氷結晶生長阻害剤を含有する事実がこうして証明される。これはこの画分で最高熱ヒステリシスが測定されるからである。

熱ヒステリシスにて活性であるこの画分は濃縮され、次にゲル電気泳動により分離される。この分離は100Vで100分、バイオーラッド, グラットブルグ, CHが市販する予め製造したゲル、レディゲルで、バイオーラッド, グラットブルグ, CHが市販するミニプロテアン11装置により行なう。

染色後、この画分に含まれるタン白の分子量はバイオーラッド, グラットブルグ, CHが市販する同じゲルで分離した26.6~1.4KD aの分子量標準範囲と比較して評価する。

熱ヒステリシスで活性の画分のタン白は4~5.5KD aの分子量を有することがこうして実証される。

Zoarcetes viviparus 血清に含まれる結晶形成阻害剤の活性に及ぼす熱の影響の研究

Zoarcetes viviparus 血清試料を2時間40°C、50°C、60°C、70°Cおよび80°Cに加熱し、次にこれらの試料の熱ヒステリシスを測定する。これらの各種試料の熱ヒステリシス値は室温に保存したZoarcetes viviparus 血清試料の熱ヒステリシス値と比較する。

このため、手順は試験「熱ヒステリシスの測定」に記載のように行なう。

これらの血清試料の熱ヒステリシス値は表Iに示す。

表 I

熱処理試料	熱ヒステリシス値 (°C)
対照試料, 20°C 2時間処理	0. 232
試料, 40°C 2時間処理	0. 208
試料, 50°C 2時間処理	0. 186
試料, 60°C 2時間処理	0. 204
試料, 70°C 2時間処理	0. 192
試料, 80°C 2時間処理	0. 204

こうして測定した熱ヒステリシス値は、*Zoarc es viviparus* 血清に含まれる結晶阻害剤は非常に高い熱安定性を示すことを実証する。これは高温工程、特に殺菌工程を含む食品製造方法でこのような剤を使用する利点である。

熱ヒステリシス値に及ぼす*Zoarc es viviparus* 血清の濃度の影響の証明

Zoarc es viviparus 血清試料を2回一蒸留水に稀釀し、これらの試料の熱ヒステリシス値を試験「熱ヒステリシスの測定」に記載の方法で測定する。

これらの血清試料の熱ヒステリシス値は表 II に示す。

表 II

2回一蒸留水に稀釀した試料	熱ヒステリシス値 (°C)
対照試料	0. 524
試料, 1/2 稀釀	0. 276
試料, 1/4 稀釀	0. 164
試料, 1/8 稀釀	0. 094

こうして得た結果は熱ヒステリシス値が *Zoarc es viviparus* 血清試料の濃度によることを証明する。この依存関係は直線ではない。
魚類血清に含まれる結晶形成阻害剤の活性の比較研究

熱ヒステリシスはニューファウンドランド沿岸に棲息する魚、ガズス・モーフア (*Gadus morhua*)、ノルウェー北部までの陸に囲まれた沿岸に棲息する魚、ポラキウス・ポラキウス (*Pollachius pollachius*)、ヨーロッパ沿岸および日本沿岸に棲息する魚、ゴビウスカラス・フラベセンス (*Gobiuscullus flavescens*)、北極およびノルウェー沿岸近くに棲息する魚、ミオキソセファラス・スコーピウス (*Myoxocephalus scorpius*)、大西洋に棲息する魚、リパリス・リパリス (*Liparis liparis*) およびビスケイ湾およびノルウェー北部までに棲息する魚、スピナチア・スピナチア (*Spinachia spinachia*) から抽出した血清試料に対し測定する。これらの各種試料の熱ヒステリシス値は *Zoarces viviparus* 血清試料の熱ヒステリシス値と比較する。

すべての魚は冬期ノルウェーのフィヨルドで捕獲し、殺した後長くても 3 時間内にこれらの魚から抽出した血清試料を使用して熱ヒステリシス測定を行なった。

このため、試験「熱ヒステリシスの測定」に記載の方法で試験を行なう。

これらの血清試料の熱ヒステリシス値は表 III に示す。

表III

血清抽出試料	熱ヒステリシス値 (°C)
<i>Gadus morhua</i>	0
<i>Pollachius pollachius</i>	0
<i>Gobiuscullus flavescens</i>	0. 4
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	0. 1
<i>Spinachia spinachia</i>	0. 2
<i>Liparis liparis</i>	0. 4
<i>Zoarces viviparus</i>	1. 4

こうして測定した熱ヒステリシス値は *Zoarces viviparus* 血清に含まれる結晶阻害剤が同様の条件下で生存する他の魚の血清に含まれる結晶

阻害剤より活性が高いことを証明する。

Zoarc es viviparus 血清を含有するアイスクリームの冰結晶の大きさの測定

Zoarc es viviparus 血清を含有するアイスクリームの冰結晶の大きさを測定し、次にこれらの結果は同一條件下で、しかしZoarc es viviparus 血清を含有させずに製造したアイスクリームの冰結晶の大きさと比較する。

このため、-40°Cに保存したZoarc es viviparus 血清を0.05%含有するアイスクリームを使用する。1cm³部分をアイスクリームマスの中央から切り取り、-10°Cの冷蔵室に移す。

3mm³のシリコーン脂肪、3mm³の1個のその部分および7滴の石油ベンジン含有試料を-10°Cでシリコーンゴム管に調製する。管は両端を閉じ、その内容物はガラス棒により混合する。

試料は顕微鏡スライドに移し、第2顕微鏡スライドで被覆する。

こうして調製した試料は光学顕微鏡下に置き、その像はビデオスクリーンで見えるようとする。結晶の二元像標本をカラー インストゥルメント AG, ブラウエライストラッセ10, CH-8610 ウステルが販売するPC-イメージ プログラムにより得る。このプログラムにより等しい直径で表わした結晶の大きさを測定する。

Zoarc es viviparus 血清を含有しないアイスクリームを使用して上記のように製造した対照品の冰結晶の大きさを測定する。

Zoarc es viviparus 血清を含有するアイスクリームの冰結晶の分布は寸法基準に基づいて対照品と比較する。

次にZoarc es viviparus 血清を含有するアイスクリーム(a)の冰結晶および対照(b)の冰結晶の分布は寸法基準に基づいて表IVに示す。

表IV

結晶の寸法 (μm)	(a) 内の分布	(b) 内の分布
0 - 10	1	0
10 - 20	162	50
20 - 30	192	132
30 - 40	116	128
40 - 50	50	76
50 - 60	14	27
60 - 70	12	12
70 - 80	0	4
80 - 90	3	0
90 - 100	0	0
100 - 110	0	0

表IVに示す結果から、Zoarcles viviparus血清を含有するアイスクリーム(a)には小寸法の結晶が大多数存在することが分かる。実際に、Zoarcles viviparus血清含有アイスクリーム(a)では、結晶は主として10~40 μm の寸法範囲に分布するが、対照(b)では、結晶は主として20~50 μm の寸法範囲に分布することを証明できる。

さらに、すべての結晶に対する寸法値から、Zoarcles viviparus血清含有アイスクリームの結晶の平均寸法を計算し、この値を対照の氷結晶の平均寸法と比較する。Zoarcles viviparus血清含有アイスクリームの氷結晶の平均寸法は27.8 μm であり、対照の氷結晶の平均寸法は33.8 μm である。

熱ショック後のZoarcles viviparus血清含有アイスクリームの氷結晶の寸法測定

Zoarcles viviparus血清含有アイスクリームおよび対照アイスクリームを36時間熱ショック処理する。熱ショックは試料を-4°Cに加熱し、次に-20°Cに冷却し、最後に-4°C~-20°Cの温度範囲で加熱および冷却

す

る温度サイクルにある。

手順は次に上記試験に記載の方法で行なう。

Zoarcetes viviparus 血清含有アイスクリームの氷結晶の分布
は寸法標準に基づいて対照アイスクリームの氷結晶の分布と比較する。

Zoarcetes viviparus 血清含有アイスクリーム (c) の氷結晶
の分布および対照 (d) の氷結晶の分布を寸法標準に基づいて下表Vに示す。

表V

結晶の寸法 (μm)	(c) 内の分布	(d) 内の分布
0 - 1 0	0	0
1 0 - 2 0	1	1
2 0 - 3 0	3 7	0
3 0 - 4 0	6 1	2
4 0 - 5 0	6 1	8
5 0 - 6 0	4 0	2 0
6 0 - 7 0	1 8	2 5
7 0 - 8 0	1 4	4 0
8 0 - 9 0	1 0	3 7
9 0 - 1 0 0	3	4 1
1 0 0 - 1 1 0	6	3 0
1 1 0 - 1 2 0	6	1 8
1 2 0 - 1 3 0	4	1 8
1 3 0 - 1 4 0	1	9
1 4 0 - 1 5 0	0	8
1 5 0 - 1 6 0	0	6
1 6 0 - 1 7 0	0	8
1 7 0 - 1 8 0	0	1
1 8 0 - 1 9 0	0	3
1 9 0 - 2 0 0	0	3

表Vに示す結果は、熱ショック後、結晶生長阻害剤を含有するZoarcetes

viviparus血清添加アイスクリームの氷結晶の寸法は血清無添加アイ

スクリームの氷結晶の寸法より小さいことを証明する。

実際に、Zoarcetes viviparus血清の存在でアイスクリームの

氷結晶の76%の寸法は60 μm 未満であるが、一方対照では、氷結晶の11%

のみが60 μm 未満の寸法である。

さらに、Zoarcetes viviparus血清の存在で、アイスクリーム

の氷結晶の6%のみが $100\text{ }\mu\text{m}$ より大きい寸法であるが、一方対照では38%の結晶が 100 pm より寸法が大きい。

最後に、すべての結晶に対する寸法値から、Zoarcles viviparus 血清を含有し、熱ショック処理したアイスクリームの氷結晶の平均寸法を計算する。次に、この値は対照の氷結晶の平均寸法と比較する。Zoarcles viviparus 血清含有アイスクリームの氷結晶の平均寸法は $50.8\text{ }\mu\text{m}$ であり、対照の氷結晶の平均寸法は $96.5\text{ }\mu\text{m}$ である。

結晶生長阻害剤含有Zoarcles viviparus 血清を添加し、次に熱ショック処理したアイスクリームでは氷結晶が部分阻害される事実が従って証明される。

Zoarcles viviparus 血清を添加した食品のテクスチャーの分析

食品のテクスチャーを分析するために、これを破壊するに要するエネルギーをテクスチャーナライザー、特にインストロン社、コロネーション ロード、ハイ ウィカム、ブックスHP123SY、英国が市販するインストロン フード テスティング インストゥルメントにより測定する。

このため、その中心から採取した直径 40 mm の円盤の食品を円形トレーに置き、直径 30 mm の円形底部を有するピストンを食品の上部表面に押しつけ、その間破壊に必要なエネルギーを測定する。

結晶生長阻害剤を含有するZoarcles viviparus 血清抽出物 1 g を添加し、次に凍結および加熱した薄くスライスしたタラフィレーを破壊するのに必要なエネルギーを測定する。次にこれらの測定値はZoarcles viviparus 血清抽出物を添加しないが、凍結、次に加熱した薄くスライ

スしたタラフィレーで行なった測定値と比較する。

比較例

従つて、 1 g のZoarcles viviparus 血清抽出物を 25 g の水に混合し、この溶液を薄くスライスした 1 Kg のタラフィレーに添加する。全体を十分に混合し、次に 40 g 部分に分割する。次に、これらの部分は -35°C で凍結する。

比較として、25gの水を1Kgの薄くスライスしたタラフィレーと混合し、次に40gの部分に分割し、対照とする。これらの対照品も-35℃で凍結する。

これらの40g部分および対照品はプラスチック袋に入れ、次にこれらは70℃の温度に加熱する。

次に、部分および対照品の破壊に必要なエネルギーを測定する。次に測定値を比較する。

Zoarcles viviparus 血清抽出物を添加した薄くスライスしたタラフィレーの破壊に必要なエネルギーは10.9+-0.3J/100gであるが、一方*Zoarcles viviparus* 血清抽出物を添加しないタラフィレーの破壊に必要なエネルギーは12+-0.3J/100gである。

これらの結果は*Zoarcles viviparus* 血清抽出物を添加し、凍結した薄くスライスしたタラフィレーは*Zoarcles viviparus* 血清抽出物を添加しないで凍結した薄くスライスしたタラフィレーより加熱後一層軟かいテクスチャーを有する事実を証明する。

固体食品のテクスチャーの顕微鏡分析

テクスチャーの顕微鏡分析を行なうために、存在する氷結晶の寸法評価に冷凍顕微鏡を使用する。

このため、40g部分のタラフィレーおよび対照品を上記比較例記載の方法で調製し、-35℃の温度でパルス空気冷凍機で凍結する。

次に、これらの冷凍40g部分試料および冷凍対照品試料を冷凍顕微鏡下で観察してこれらの各種試料の氷結晶の寸法を評価し、比較する。

氷結晶生長阻害剤を含有する*Zoarcles viviparus* 血清抽出物を添加し、次に冷凍した薄くスライスしたタラフィレーに含まれる氷結晶の寸法

は、*Zoarcles viviparus* 血清抽出物を添加しない薄くスライスした冷凍タラフィレーに含まれる氷結晶の寸法より小さい事実が証明される。

従って*Zoarcles viviparus* 血清抽出物の添加により、凍結中特に固体または繊維性食品で氷結晶の大きさの増加により生ずる損傷を回避でき

る。

次例は本発明結晶生長阻害剤を食品部門における一工業的使用の説明として示す。下記例では、%は特記しない限り重量により示す。

例1

結晶生長阻害剤を含有するZoarcес viviparus血清をアイスクリームの製造に使用する。

このため、92.3 gの脱脂粉乳、150 gの蔗糖、26.2 gのグルコースシラップおよび5 gの乳化剤を65°Cで494 gの水に溶解する。

4 gのバニラフレーバおよび35%の脂肪を含有する228.5 gのクリームをそこに添加する。

この調製物はキンドラー マシーネン AG, ポストファッハ 297, CH-8021 チューリッヒが販売するラニエ型ホモジナイザーで、最初は140バールで、2回目は40バールの連続2回の操作で均質化する。

均質化した製品は83°C、30秒プレート交換機で殺菌する。

4°Cに冷却し、この温度に12時間放置後0.05%のZoarcес viviparus血清を添加し、APVテクノロジイ社、アクセル キールスベージュ 28-30, DK-8270, アーフス・ホブジャーグが販売するホイエルMF50型冷凍機で冷凍する。

起泡性テクスチャーを有するアイスクリームをこうして得る。

次にこのアイスクリームはパルス空気冷却セルで硬化させ、-35°Cで貯蔵する。

-18°Cでテンパリング後、このアイスクリームは滑かで、すべすべしたテクスチャーを有する。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/00547

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A23J3/12 A23J1/04 A23J1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A23J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 12722 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 6 August 1992 see page 9-10, line 30-31; claims 1,2,9-11,15 see page 15-23; claims 16,20,23-26 see page 15, line 26-34 see page 17, line 34 - page 18, line 25; table 1A see page 68; claims 30,33,36,37 ---	1,3,5
Y	---	1-5,7

 Further documents are listed in the continuation of box C. Parent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document not published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention.

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 2 April 1997	Date of mailing of the international search report 16.04.97
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5018 Patentam 2 NL-3200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax. 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Kambier, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/00547

C./Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation or document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FOOD TECHNOLOGY, vol. 47, no. 1, 1 January 1993, pages 82, 84-88, 90, XP000338468 FEENEY R E ET AL: "ANTIFREEZE PROTEINS: PROPERTIES, MECHANISM OF ACTION, AND POSSIBLE APPLICATIONS" see page 82, right-hand column see page 86, right-hand column, paragraph 4 see page 87, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 ---	1-5,7
A	see page 82, right-hand column see page 86, right-hand column, paragraph 4 see page 87, left-hand column, paragraph 3 - right-hand column, paragraph 1 ---	8
Y	POLAR BIOLOGY. vol. 1, no. 2, 1982. pages 115-123, XP000575107 SCHNEPPENHEIM, THEEDE: "FREEZING-POINT DEPRESSING PEPTIDES AND GLYCOPROTEINS FROM ARCTIC-BOREAL AND ANTARCTIC FISH" see page 116, right-hand column; tables 1,3 see page 117, right-hand column, paragraph 3; table 4 see figure 6; table 6 ---	1-5,7
A	see page 116, right-hand column; tables 1,3 see page 117, right-hand column, paragraph 3; table 4 see figure 6; table 6 ---	2
A	CANADIAN JOURNAL OF ZOOLOGY, vol. 66, no. 2, 1988. pages 2611-2617, XP000571714 DAVIES, HEW, FLETCHER: "fish antifreeze proteins: physiology and evolutionary biology" see figure 2; tables 2,3 ---	1-3
A	FOOD PROCESSING, 1992. page 55 XP000571336 SWIENTEK: "frozen foods with 'fresh' qualities" see page 55 -----	6-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 97/00547

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9212722 A	06-08-92	AU 659795 B	01-06-95
		AU 7335491 A	05-08-91
		EP 0511317 A	04-11-92
		JP 8009521 B	31-01-96
		JP 5503706 T	17-06-93
		US 5358931 A	25-10-94
		WO 9110361 A	25-07-91

フロントページの続き

(81)指定国 E P (AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF
, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE,
SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ,
UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD
, RU, TJ, TM), AL, AU, BB, BG, BR
, CA, CN, CZ, EE, GE, HU, IL, IS,
JP, KP, KR, LK, LR, LT, LV, MD, MG,
MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO
, SG, SI, SK, TR, TT, UA, US, UZ,
VN